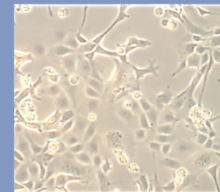
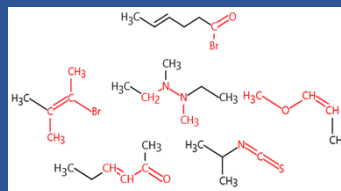
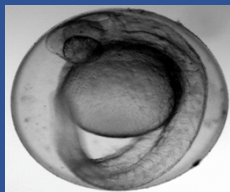


LES INFORMATIONS DE LA COORDINATION NATIONALE POUR LES LIGNES DIRECTRICES DE L'OCDE



DECEMBRE 2024

Ineris - 227299 - 2819687 - v.1.0

Éditorial

Comme chaque année, cette période correspond à la phase de soumission des nouveaux sujets (SPSF) en vue de leur intégration dans le programme de travail des lignes directrices de l'OCDE. Vingt-cinq propositions ont été reçues par le Secrétariat et communiquées aux Coordinateurs Nationaux des différents Pays Membres afin que ceux-ci se positionnent sur la pertinence de développer ces projets et de définir leurs niveaux d'implication respectifs. Les propositions relatives à la section 4 « Effets sur la santé » restent toujours majoritaires. Concernant les projets en lien avec la section 2 « Effets sur les systèmes biologiques », il convient de noter les interactions avec les comités techniques de l'ISO « Qualité de l'eau » et « Qualité du sol » pour engager des développements communs.

Contrairement aux années précédentes, la date pour se prononcer sur ces nouveaux sujets et transmettre des commentaires a été avancée au 20 décembre. La décision ou non d'intégrer ces sujets dans le programme de travail des lignes directrice ne sera prise que lors de la réunion annuelle des Coordinateurs Nationaux au tout début du mois d'avril 2025. Si vous souhaitez réagir et vous positionner sur celles-ci, les coordonnées de vos interlocuteurs sont reprises à la dernière page de cette lettre d'information.

La présente lettre d'information vous propose aussi un focus sur les activités de l'OCDE sur les cancérigènes non génotoxiques (NGTxCs) rédigé par le Pr. Paule VASSEUR (Université de Lorraine) et Marc AUDEBERT (Inrae).

→ Nouveaux sujets proposés

NOUVELLES LIGNES DIRECTRICES

- **Test de toxicité sur larves d'amphibiens (LATT)** (pilote : Etats-Unis)

L'Agence américaine de protection de l'environnement (EPA) a développé un programme de dépistage des perturbateurs endocriniens (EDSP) pour identifier les pesticides et autres produits chimiques susceptibles d'interagir avec les voies des œstrogènes, des androgènes et de la thyroïde. L'EDSP définit une démarche expérimentale à deux niveaux qui comprend le test de métamorphose des amphibiens (AMA) comme test *in vivo* de niveau 1 et le test de croissance et de développement des larves d'amphibiens (LAGDA) comme test de niveau 2.

L'EPA propose un test alternatif *in vivo* sur les amphibiens, appelé test de toxicité des larves d'amphibiens (LATT). Le LATT utilise *Xenopus laevis* et débute au stade de développement Nieuwkoop et Faber (NF) 51, similaire à l'AMA, mais le test se poursuit jusqu'à la fin de la métamorphose au stade NF 66, permettant d'obtenir des données sur la métamorphose, la croissance et la survie ainsi qu'une possible activité sur le système thyroïdien.

Le LATT est destiné à être utilisé comme essai alternatif sur les amphibiens qui peut fournir des données adaptées à l'évaluation des risques, améliorant ainsi l'efficacité et réduisant potentiellement le nombre total de tests *in vivo* nécessaires pour une substance chimique donnée.

- **Caractérisation de la clairance hépatique et de la liaison aux protéines plasmatiques chez l'homme à l'aide de méthodes *in vitro* et intégration dans une approche définie pour les caractéristiques toxicocinétiques** (Pilotes : Etats-Unis, Commission Européenne)

L'UE et les États-Unis proposent une nouvelle ligne directrice pour la caractérisation de la clairance hépatique intrinsèque chez l'homme et la liaison aux protéines plasmatiques à l'aide de méthodes *in vitro*. Il s'agirait d'intégrer ces deux paramètres toxicocinétiques expérimentaux dans une approche définie qui permettrait la définition d'un profil toxicocinétique de base grâce à la dérivation de la demi-vie chimique, la concentration moyenne dans le sang à l'état d'équilibre et le profil temporel décrivant la concentration dans le sang d'une substance chimique (aire sous la courbe, AUC).

- **Test des comètes en conditions alcalines *in vitro* et modifié à l'aide d'enzymes de réparation** (Pilotes : Autriche, Croatie)

Le test alcalin des comètes et sa modification, le test enzymatique des comètes, sont parmi les méthodes les plus utilisées pour l'évaluation de la génotoxicité des produits chimiques et des nanomatériaux (NM). La communauté scientifique a travaillé pendant au moins trois décennies sur la normalisation et la pré-validation de ces méthodes et une grande quantité de données a été collectée.

En particulier, l'action COST hCOMET (CA15132) a travaillé sur la normalisation et la pré-validation du test des comètes, tout en recueillant des données sur des lignées cellulaires testées avec des produits chimiques et des NM. La communauté hCOMET a produit deux numéros spéciaux - sur la biosurveillance *in vitro* et humaine - de Mutation Research et a publié trois articles dans Nature Protocols. D'autres études interlaboratoires ont été menées dans le cadre du projet H2020 RiskGONE.

Sur la base de ces travaux, un projet de nouvelle ligne directrice porté par l'Autriche et la Croatie, se propose d'analyser l'information disponible. La première phase permettra la rédaction d'un rapport de validation, une étape préalable à la conception de la ligne directrice dont la rédaction sera finalisée lors de la deuxième phase du projet.

- **Essai ToxTracker pour la caractérisation mécaniste de la génotoxicité : un essai par gène rapporteur basé sur des cellules souches** (Pilote : Pays-Bas)

ToxTracker est un test, basé sur les cellules souches, qui utilise un système de gène rapporteur exploitant la protéine fluorescente verte (GFP) pour caractériser le danger et le mode d'action de substances potentiellement génotoxiques. Le protocole de cet essai prévoit l'inclusion de la fraction S9 pour permettre une caractérisation des composés parents ainsi que de leurs métabolites.

ToxTracker fournit des informations sur divers phénomènes génotoxiques : mutagenèse, cassures du double brin de l'ADN/clastogénicité, aneuploïdie. En parallèle, ToxTracker génère également des données qui renseignent sur des phénomènes supplémentaires tels que le stress oxydatif et les réponses aux protéines de conformation anormale, qui peuvent être pertinentes pour l'interprétation des résultats de génotoxicité dans le cadre, par exemple, d'une approche fondée sur le poids de la preuve.

- **Essai de transformation cellulaire sur les cellules Bhas 42** (Pilote : Japon)

Le Japon propose à nouveau un projet pour la rédaction d'une nouvelle ligne directrice basée sur le document guide 231 de l'OCDE sur l'essai de transformation cellulaire *in vitro* Bhas 42. Cette nouvelle soumission est accompagnée par des données supplémentaires pour répondre aux questionnements exprimés lors de la précédente soumission. Ces questionnements, avaient aussi motivé une discussion sur ce projet au sein du groupe de travail sur les IATA pour les cancérogènes non génotoxiques.

Cette discussion a porté sur la pertinence de l'essai Bhas 42 pour la caractérisation de la transformation morphologique des cellules. Il a été conclu que cette approche pourrait intégrer une IATA dont l'objectif serait de permettre la prédiction, sur la base de plusieurs lignes d'évidence *in vitro* complémentaires à l'essai Bhas 42, du potentiel des substances chimiques à induire des tumeurs *in vivo*.

- **Inhibition des Déiodinases humaines (DIO1, DIO2 et DIO3)** (Pilote : Royaume-Uni)

Ce projet de nouvelle ligne directrice, proposé par le Royaume-Uni, a pour objectif de déterminer la capacité d'une substance chimique à agir sur le système hormonal thyroïdien en modulant l'activité des déiodinases (DIO) recombinantes humaines et de rat de types 1, 2 et 3 (appelées respectivement : DIO1, DIO2 et DIO3).

La méthode, déjà utilisée chez Concept Life Sciences, se base sur la surexpression des DIO dans les cellules HEK293 (Human embryonic kidney 293 cells). Après incubation avec les DIO recombinantes, les échantillons sont prélevés et analysés par MS/LC-MS pour la quantification de formes déiodées de l'hormone thyroïdienne.

Dans ce même domaine, il convient de rappeler le projet, proposé par la France et l'Allemagne relatif à l'évaluation colorimétrique de l'activité des déiodinases de type 1 basée sur la réaction de Sandell-Kolthoff avec des microsomes humains (essai DIO1-SK) accepté en avril 2024 dans le programme des lignes directrices.

- **Inhibition de la thyroperoxydase (TPO) humaine et de rat (Pilote : Royaume-Uni)**

Dans le cadre de la caractérisation du métabolisme thyroïdien, le Royaume-Uni a également proposé un projet de nouvelle ligne directrice portant sur l'inhibition de la thyroperoxydase (TPO). La TPO catalyse la synthèse des hormones thyroïdiennes thyroxine (T4) et triiodothyronine (T3). Elle oxyde les ions iodures pour former des molécules d'iode qui se complexent à la tyrosine de la thyroglobuline pour former la thyroxine (T4) ou la triiodothyronine (T3).

L'essai concerné par ce projet est élaboré par Concept Life Sciences et exploite l'activité enzymatique de microsomes issues de la glande thyroïde d'une espèce d'intérêt (Homme et rat pour le projet soumis). D'un point de vue moléculaire, ce test quantifie l'activité de la TPO en suivant l'oxydation du gaïacol et utilise l'eau oxygénée comme donneur d'hydrogène.

RÉVISION DE LIGNES DIRECTRICES EXISTANTES

- **LD 211 « *Daphnia magna* – Essai de reproduction »** (Pilotes : Japon, Corée)

Cette proposition de révision de la ligne directrice 211 de l'OCDE, Essai de reproduction sur *Daphnia magna*, a un double objectif :

- Ajouter deux nouvelles espèces de Cladocères (*Ceriodaphnia dubia* et *Moina macrocopa*) comme organismes tests avec des conditions d'essai et des critères de validité adaptés pour chaque espèce ;
- Mettre à jour le protocole détaillé pour *Daphnia magna* (par exemple, l'utilisation de solvants, l'analyse statistique, l'annexe 7) pour être en cohérence avec la ligne directrice 253 de l'OCDE récemment approuvée, Essai de dépistage à court terme de l'activité hormonale juvénile sur *Daphnia magna*.

Cette proposition, si elle est acceptée en l'état, nécessitera de renommer la ligne directrice 211 (par exemple, « Essai de reproduction sur espèces de Cladocères »).

- **LD 429 « Sensibilisation cutanée – Essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques »** (Pilote : Allemagne)

L'essai sur les ganglions lymphatiques locaux (LLNA) est un essai *in vivo* permettant d'identifier les substances sensibilisantes pour la peau en mesurant l'incorporation de thymidine radioactive dans les ganglions lymphatiques. Bien que plusieurs méthodes non animales et leurs combinaisons en tant qu'approches définies aient été adoptées comme lignes directrices de l'OCDE, le domaine d'applicabilité des approches définies remplaçant les tests de sensibilisation cutanée sur les animaux est actuellement limité à des substances organiques. En outre, le LLNA reste l'essai réglementaire obligatoire dans certains pays.

L'Allemagne propose d'ajouter une quantification alternative de la prolifération des ganglions basée sur une approche non radioactive, en tant qu'amélioration de la ligne directrice 429. L'essai, qui est proposé d'ajouter à la ligne directrice 429, est identique à la méthode d'essai adoptée dans tous ses aspects, à l'exception de l'approche consistant à évaluer la prolifération des ganglions lymphatiques directement en comptant les cellules au lieu de mesurer la radioactivité incorporée dans les cellules en prolifération. L'adoption d'un comptage cellulaire, en complément de l'incorporation de thymidine radiomarquée, présente un avantage pour le bien-être des animaux, réduit la variabilité (pas d'injection dans la veine caudale) et supprime l'utilisation de produits radiochimiques.

- **LD 431 « Corrosion cutanée *in vitro* : Essai sur modèle de peau humaine » et LD 439 « Irritation cutanée *in vitro* : Essai sur épiderme humain reconstitué »** (Pilotes : France, Secrétariat OCDE)

Cette révision a pour objectif de mettre à jours ces deux lignes directrices à la suite de l'arrêt de la commercialisation du modèle de peau reconstitué EpiSkin™.

- **LD 442B « Sensibilisation cutanée – Essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques : BrdU-ELISA »** (Pilote : Japon)

L'objectif de cette proposition japonaise est d'inclure le critère de sous-catégorisation du GHS pour le LLNA BrdU-ELISA dans la LD 442B. La validité scientifique de ce critère a été confirmée par le groupe d'experts de l'OCDE sur la sensibilisation cutanée. Ce critère de sous-catégorisation a ensuite été proposé au sous-comité du GHS, qui a

accepté de l'inclure dans le dernier document des Nations unies (rev.10, 2023). Toutefois, la description du critère figurait dans une note de bas de page.

Ce positionnement de l'information a été motivé par le fait que le critère de sous-catégorisation n'a pas été inclus dans la LD 442B et le Japon souhaite remédier à cet inconvénient en révisant cette ligne directrice.

- **LD 456 « Essai de stéroïdogénèse H295R »** (Pilote : Secrétariat OCDE)

En 2022, la LD 456 (essai H295R pour la caractérisation de la stéroïdogénèse) a été révisée et une nouvelle procédure d'interprétation des données a été adoptée. Cette nouvelle procédure introduit un nouveau critère pour établir la positivité d'un résultat.

Toutefois, il est récemment apparu que cette nouvelle procédure entraîne des changements dans les résultats de certains produits chimiques de référence « proficiency chemicals »).

Ce problème a été mis en évidence par le travail de validation réalisé dans le cadre du projet de la plateforme PEPPER sur une amélioration de la LD 456 (profilage LC-MS du métabolome H295R) et, par conséquent, une mise à jour est nécessaire afin d'aligner les préconisations en ce qui concerne les en termes de résultats attendus pour les substances de référence et les résultats générés sur les substances soumises à essai.

- **LD 491 « Méthode d'essai d'exposition de courte durée *in vitro* pour l'identification des produits chimiques i) provoquant des lésions oculaires graves ou ii) ne relevant d'aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave »** (Pilotes : France, Japon)

Ce projet a été proposé pour répondre à une demande formulée lors d'une discussion au sein du groupe d'experts de l'OCDE sur l'irritation oculaire. Ce questionnement portait sur le projet français relatif à la mise à jour de la LD 467 visée à l'inclusion d'une approche définie les surfactants (DASF).

De façon plus précise, il a été identifié qu'une mise à jour du document LD 491 était nécessaire pour inclure une adaptation (méthode STE^{0.5}) de la méthode d'essai d'exposition de courte durée pouvant garantir l'acceptabilité mutuelle des données pour la DASF. Cette proposition vise donc à inclure dans la LD 491 des informations sur l'application de la méthode STE^{0.5} pour les surfactants

La révision proposée est subordonnée à l'approbation du projet sur la mise à jour de la LD 467.

- **LD 497 « Approches définies pour la sensibilisation cutanée »** (Pilote : Japon)

L'objectif de cette proposition du Japon est d'inclure dans la LD 497 une autre approche définie pour la sensibilisation cutanée, à savoir la stratégie d'essai nommée RTS se basant sur l'épiderme humain reconstruit. La RTS intègre l'essai de sensibilisation cutanée (EpiSensA) et la plateforme informatisée « Times Metabolism Simulator for prediction Skin Sensitisation » (TIMES-SS ; RTSv1) ou l'option automatisée de la QSAR Toolbox de l'OCDE (RTSv2). Dans le cadre de ces deux approches, il est possible de générer des informations compatibles avec la sous-catégorisation du GHS avec une performance prédictive comparable ou supérieure aux approches définies existantes.

D'un point de vue de leur applicabilité, les RTSv1/v2 ne requièrent que les résultats d'EpiSensA comme résultats *in vitro* et, par conséquent, elles présentent un domaine d'application plus large que les autres approches définies pour la sensibilisation cutanée.

- **Révision ciblée des lignes directrices de l'OCDE 407, 408, 422, 421 (toxicologie) ainsi que des lignes directrices 203, 210 et 236 (écotoxicologie) afin d'intégrer la cryoconservation facultative des échantillons** (Pilote : Commission Européenne)

Les études *in vivo* réalisées dans un cadre réglementaire (e.g. REACH) offrent la possibilité de collecter et de conserver des échantillons par cryoconservation), ce qui permettrait de générer des données au niveau moléculaire, telles que les données omiques.

L'inclusion de la cryoconservation facultative des échantillons dans les lignes directrices serait essentielle pour promouvoir l'utilisation de données omiques dans le contexte des cadres réglementaires existants tels que REACH. En parallèle, l'inclusion de la cryoconservation facultative dans les lignes directrices permettrait également aux CRO de se préparer à ce type de demandes.

Pour ces raisons, la Commission Européenne propose une révision ciblée des lignes directrices suivantes : LD 407, LD 408, LD 422, LD 421, et, pour l'écotoxicologie, les LD 203, LD 210 et LD 236.

- **Révision ciblée des lignes directrices de l'OCDE 210, 211, 212, 215, 229, 230, 231,234, 240, 241 et 253 afin d'intégrer une option d'exposition par voie alimentaire dans le cas des substances chimiques à faible solubilité dans l'eau** (Pilotes : Royaume-Uni, Danemark)

Cette proposition a pour objectif d'intégrer, dans les lignes directrices pour lesquelles les durées d'exposition des organismes nécessitent l'apport de nourriture, une option pour une exposition par la voie alimentaire pour les substances chimiques à faible solubilité dans l'eau. Cette proposition, si elle est acceptée, s'appliquera aux lignes directrices 210, 211, 212, 215, 229, 230, 231,234, 240, 241 et 253.

AUTRES TRAVAUX / DOCUMENTS

- **Révision du document guide 54 « Approches actuelles dans l'analyse statistique des données d'écotoxicité : guide d'application »** (Pilote : Allemagne)

La révision proposée par l'Allemagne a pour objectif initial de corriger plusieurs problèmes identifiés dans le document actuel (qui date de 2006), tels que des références erronées, des logiciels obsolètes et certaines redondances. En outre, la mise à jour va permettre d'intégrer les avancées récentes en analyses statistiques, notamment les mesures de variance pour les tests d'hypothèses et d'incertitude, les méthodes améliorées d'analyse des données de comptage, l'intégration de techniques modernes de régression non linéaire et, dans une certaine mesure, l'application de modèles linéaires généralisés (GLM). Ces mises à jour devraient garantir que le document guide reflète les derniers développements en matière de méthodes statistiques, et devrait améliorer sa convivialité et sa pertinence pour les utilisateurs. Enfin le document révisé devrait améliorer l'efficacité des évaluations statistiques et réduire la nécessité de répétition des tests.

Il convient également de mentionner qu'une démarche parallèle a été entreprise à l'ISO/TC 147/SC 5 pour réviser l'ISO/TS 20281 « Qualité de l'eau — Lignes directrices relatives à l'interprétation statistique de données écotoxicologiques ». La révision des deux documents va se faire de conjointe, l'Allemagne portant les deux actions.

- **Révision du document Guide 150 sur les essais standardisés permettant de caractériser le potentiel de perturbation endocrinienne des substances chimiques** (Pilotes : Royaume-Uni, Danemark, Belgique)

Le document guide 150, relatif aux essais standardisés permettant de caractériser le potentiel de perturbation endocrinienne des substances chimiques n'a pas été mis à jour depuis 2018. Cependant, plusieurs nouvelles lignes directrices portant sur la caractérisation de la perturbation du système endocrinien ont été adoptées au cours des six dernières années.

Le Royaume-Uni, le Danemark et la Belgique proposent donc une mise à jour de ce document guide afin d'inclure les nouvelles lignes directrices, les avancées en termes de IATA, les résultats issus de projets internationaux tels que PARC, et les NAM élaborées dans le cadre des projets du cluster EURION.

- **Révision du document Guide 286 sur les bonnes pratiques relatives aux méthodes *in vitro* (GIVIMP)** (Pilote : Royaume-Uni)

L'objectif de ce projet est d'inclure des critères de vérification au sein des bonnes pratiques applicables aux méthodes *in vitro* afin de permettre, aux entités intéressées par l'utilisation de sérum et autres réactifs humains (ex. sérum, microsomes), de vérifier que toutes les questions éthiques relatives à la production à la sécurité ont été prises en compte par les fournisseurs.

Ces exigences en termes d'information avaient été débattues lors d'un workshop de l'OCDE afin de prendre en compte plusieurs aspects liés à la procédure de don, y compris la santé du donneur, la protection des personnes censées utiliser ce matériel en laboratoire, l'autorisation du donneur pour une utilisation commerciale, la rémunération des donneurs et le potentiel d'exploitation des populations à faible revenu, la traçabilité du sérum et les besoins en ce qui concerne les Bonnes Pratiques de Laboratoire.

- **Document guide relatif à l'évaluation de la vitellogénine dans les essais poissons** (Pilotes : Royaume-Uni, Danemark)

L'objectif de ce projet est d'élaborer un document qui harmonise les approches et détaille les meilleures approches / techniques pour l'évaluation de la vitellogénine (VTG) dans les études réglementaires liées aux lignes directrices sur les poissons. La question de la variabilité naturelle des concentrations de VTG dans les poissons apparaît comme un paramètre essentiel qui a été récemment soulevée lors d'un bilan exhaustif des connaissances scientifiques dans ce domaine.

Ce projet s'appuie sur des travaux antérieurs (revue de la littérature et enquête mondiale) auprès des laboratoires qui conduisent ce type d'études et qui ont identifié la nécessité d'un tel document d'orientation. En mai 2024, un workshop a été organisé dans le cadre de la SETAC pour définir les aspects clés concernant l'évaluation de la VTG qui devraient être couverts par ce type de document. L'atelier a réuni 42 experts invités, dont des représentants de laboratoires générant des données sur la VTG, des agences gouvernementales/réglementaires qui utilisent les données sur la VTG dans la prise de décision, des sponsors industriels de ce type d'études, des développeurs de méthodes/fournisseurs de kits VTG, universitaires, cabinets de conseil et autres organisations scientifiques à but non lucratif.

Les conclusions de ce workshop constituent la base de la proposition de ce projet de document guide.

- **Etat de l'art sur le remplacement de la tourbe comme source de matière organique dans les essais d'écotoxicité terrestre et du sédiment** (Pilotes : Suisse, France, Etats-Unis, Finlande, Canada (potentiel, BIAC)

Plusieurs pays de l'OCDE ont pris des initiatives pour réduire l'utilisation de la tourbe et la dégradation des tourbières. Les restrictions d'utilisation de la tourbe et la dégradation des tourbières vont donc avoir à terme une incidence sur les tests réalisés pour évaluer les effets de substances chimiques dans les sols et sédiments, dans lesquels la tourbe est utilisée comme source de matière organique (MO) dans les substrats artificiels. Pour assurer la réalisation de ces essais conformément aux lignes directrices de l'OCDE, il convient de développer une alternative à la tourbe comme composant organique des substrats artificiels.

La première étape pour atteindre cet objectif consiste à préparer une synthèse détaillée pour identifier les alternatives possibles à la tourbe pour les tests sur sols et sédiments. L'état de l'art bibliographique proposé couvrira notamment les aspects suivants :

- L'identification des alternatives possibles à la tourbe comme sources de matière organique pour les formulations de sols et sédiments artificiels ;
- L'identification des propriétés physico-chimiques et biologiques des matériaux MO alternatifs sélectionnés ;
- L'évaluation des paramètres de performance biologique des organismes tests (par exemple, survie, reproduction, croissance) dans les formulations de sols et sédiments artificiels en utilisant les matériaux alternatifs ;
- Le recueil des données écotoxicologiques disponibles obtenues en utilisant des formulations de sols ou sédiments artificiels avec les matériaux alternatifs ;
- L'accessibilité aux sources alternatives de matière organique.

Sur la base de cette analyse bibliographique, Le document permettra de recommander les prochaines étapes nécessaires pour proposer un matériau de remplacement de la tourbe approprié et notamment de définir les modalités de l'étude de validation associée (nombre d'espèces et substances chimiques à considérer). Celles-ci feront l'objet d'un nouveau SPSF à l'issue de la publication de l'état de l'art.

- **Etat de l'art sur la toxicocinétique *in vitro*** (Pilote : Japon)

Le Japon propose de réaliser un état de l'art en vue d'analyser et de discuter la pertinence des systèmes microphysiologiques (SMP) pour la prédiction de l'exposition interne aux produits chimiques.

Les potentialités et limites des nouveaux systèmes de culture cellulaire développés ces dernières années, tels que les SMP, pour la caractérisation de la toxicocinétique seront examinées. Le développement de critères d'évaluation, de spécifications, de performances et de méthodes d'analyse sera examiné et proposé pour développer des méthodes d'essai alternatives au contenu répertorié par la LD 417.

Les avancées scientifiques en ce qui concerne les modèles *in vitro* pour l'estimation des concentrations sanguines de substances chimiques ingérées par voie orale seront examinées, ainsi que les possibilités d'harmonisation avec le système expert, Metapath, qui documente les données de la LD 417.

- **Définition de modalités précises sur la manière de tester les substances peu solubles dans les lignes directrices visant à étudier les propriétés des substances chimiques à perturber le système endocrinien, conformément au document guide 23** (Pilotes : Commission Européenne, Danemark, Pays-Bas)

Plusieurs lignes directrices examinant les effets PE des substances chimiques sur les organismes aquatiques proposent des approches détaillées dans la sélection des concentrations d'essai en raison de la nécessité de différencier les effets endocriniens réels des effets confondants induits par l'influence d'autres effets toxiques. Dans certains tests, la concentration d'essai la plus élevée peut être fixée soit à la concentration maximale tolérée (MTC),

à la concentration de 10 mg/L ou 100 mg/L, soit à la limite de solubilité de la substance dans l'eau. Dans d'autres tests, il est recommandé d'éviter de tester au-dessus de la limite de solubilité dans le milieu d'essai.

La possibilité de fixer la concentration d'essai la plus élevée à la limite de solubilité d'une substance peu soluble sans fournir d'instructions et d'exigences claires sur la manière d'identifier cette limite entraîne souvent plusieurs incertitudes dans la décision réglementaire pour l'évaluation des effets PE et l'évaluation des risques. Dans le premier cas, si les concentrations d'essai sélectionnées sont trop faibles pour provoquer des effets sur les paramètres étudiés, il ne sera pas possible de comprendre pleinement si l'absence d'effets est due aux faibles concentrations ou à une absence réelle d'effet endocrinien. Cela soulève évidemment plusieurs incertitudes pour l'utilisation réglementaire de ces études, conduisant potentiellement à leur rejet et entraînant une utilisation supplémentaire évitable d'animaux vertébrés.

Étant donné que le document guide 23 de l'OCDE, relatif aux essais de toxicité aquatique sur les substances difficiles et les mélanges, est disponible, sa mise en œuvre systématique dans les lignes directrices déjà publiées pourrait être déterminante pour assurer l'harmonisation des approches, éliminer les incertitudes identifiées et également minimiser l'utilisation des vertébrés. Il est donc proposé de réviser certaines lignes directrices (211, 229, 230, 231, 234, 240, 241, 242, 243, 248, 250, 251, 252, 253) et documents guides (201, 379) en proposant une approche homogène mettant en œuvre les recommandations du document guide 23 de l'OCDE pour tester les substances peu solubles.

- **Validation de tests de prolifération cellulaire pour la caractérisation d'évènements clés pour la cancérogénicité non génotoxique** (Pilotes : Royaume-Uni, BIAC)

Le Royaume-Uni et le BIAC proposent d'effectuer une validation rétrospective et, éventuellement, prospective de la prolifération cellulaire *in vivo* et *in vitro*, afin de développer des lignes directrices (une LD pour les approches *in vitro* et une LD pour les approches *in vivo*) pouvant traiter un événement clé tardif et critique (la prolifération cellulaire) déjà analysé dans le cadre des travaux de l'OCDE sur les cancérogènes non génotoxiques (NGTxC).

Cette proposition s'inscrit dans un contexte d'étude qui a été approfondi lors des travaux du groupe d'experts « IATA NGTxC » de l'OCDE et les approches proposées n'ont pas vocation à être autonomes mais elles feront partie de la batterie d'essais composant une IATA. Les tenants et aboutissants de cette stratégie de test ont été décrits par Louekari & Jacobs (A modular strategy for the testing and assessment of non genotoxic carcinogens, Archives of Toxicology (2024) 98:2463–2485).

- **Développement d'un modèle QSAR pour la prédiction de la sensibilisation cutanée** (Pilote : Japon)

Dans le cadre d'une mise à jour potentielle de la LD 497, le Japon a proposé un modèle QSAR consensus composé par trois modèles différents : modèle basé sur la détection d'alertes structurelles pour la sensibilisation cutanée, un modèle calibré en fonction de données LLNA et un modèle calibré en fonction de données GPMT.

Le contexte d'utilisation proposé pour ce modèle consensus prévoit deux scénarii. Le premier scénario consisterait à utiliser ce modèle à la place du binôme Derek/QSAR Toolbox décrit par la LD 497 grâce à une performance prédictive déclarée comme étant supérieure. Le deuxième scénario d'utilisation se base sur une approche prédictive calibrée en fonction d'une combinaison de l'essai h-CLAT et du modèle de consensus qui, selon les porteurs du projet, serait caractérisée par une performance prédictive équivalente à celle de l'ITSv1/v2 de la LD 497.

→ Points d'actualité

Activités de l'OCDE sur les cancérogènes non génotoxiques (NGTxCs)

Le cancer figure parmi les premières causes de mortalité dans les pays développés. La préoccupation relative au potentiel cancérogène des substances chimiques a très tôt suscité le développement et la mise en œuvre d'un certain nombre de lignes directrices de l'OCDE pour l'identification et l'évaluation de la génotoxicité des substances chimiques, conduisant à l'identification des cancérogènes génotoxiques¹. Aucune approche n'existe par contre pour l'identification des cancérogènes non génotoxiques¹. Les tests de cancérogénèse sur rongeurs sont requis réglementairement pour l'évaluation des produits phytosanitaires, des biocides et des médicaments, mais aucune juridiction/législation ne demande ces essais *in vivo* pour les substances chimiques, même pour les substances produites à haut tonnage (plus de 1000 tonnes/an dans le cadre du règlement REACH pour lequel ces essais ne sont pas demandés de façon systématique). De sorte que les cancérogènes non génotoxiques échappent au crible

¹ A genotoxic carcinogen has the potential to induce cancer by interacting directly with DNA and/or the cellular apparatus involved in the preservation of the integrity of the genome. A non-genotoxic carcinogen has the potential to induce cancer without interacting directly with either DNA or the cellular apparatus involved in the preservation of the integrity of the genome (Jacobs et al 2020).

de l'évaluation réglementaire ; avec les possible conséquences qui s'en suivent en termes de coût pour la santé humaine. De plus, des différences inter-espèces ont mis en doute la possibilité de toujours pouvoir extrapoler les résultats issus des expérimentations sur les rongeurs pour prédire le risque cancérigène pour l'Homme des substances chimiques.

Historiquement, dès les années 70, des essais *in vitro* ont été développés pour identifier les NGTxCs : ces essais sont basés sur les modifications phénotypiques accompagnant la transformation néoplasique et/ou sur le dysfonctionnement de la communication intercellulaire. Au début des années 2000, l'intérêt de l'OCDE pour les essais de transformation cellulaire (CTA) en vue de la détection *in vitro* d'un potentiel cancérigène a abouti à la publication d'une revue synthétisant les résultats et analysant les performances de ces essais (*Detailed Review Paper* N°31, OECD 2007). L'OCDE a publié des documents guide (*Guidance Document*) pour la réalisation des CTA dès 2015 (GD 214, GD 231) et conclut que les CTA pouvaient s'inscrire dans une démarche intégrant les aspects mécanistiques du processus multi-étapes de la cancérogénèse.

En mars 2016, l'OCDE a mis en place un groupe d'experts (GE) chargé de développer une approche intégrée pour les essais et l'évaluation (IATA, *Integrated Approach for Testing and Assessment*) des cancérogènes non génotoxiques.

Le GE s'est d'abord attaché à recenser et analyser les marqueurs et les étapes clés des mécanismes de cancérogénèse non génotoxiques, les modes d'action conduisant au cancer, ainsi que les tests existants permettant leur étude.

Ces tests ont été regroupés en « bloc d'essais » selon la représentativité des marqueurs étudiés par rapport au niveau moléculaire (précoce), cellulaire (intermédiaire), ou tissulaire (tardif) et selon le degré d'adversité et de spécificité des fonctions biologiques ciblées : les marqueurs moléculaires, les fonctions biologiques, et les mécanismes couvrant par exemple « la liaison aux récepteurs et transactivation de récepteurs humains, l'induction enzymatique/CYP450, la communication intercellulaire, les indicateurs de stress oxydant, les dommages cellulaires, la réponse immunitaire, l'apoptose, l'instabilité génétique, la sénescence, les mécanismes épigénétiques, la prolifération cellulaire, la transformation cellulaire,... »).

Ces blocs d'essais ont ensuite été mis en regard du continuum « initiation – promotion - progression - formation tumorale » caractérisant le développement du processus cancéreux, en vue de la construction du IATA.

Le IATA pour les NGTxC a été structuré selon l'esprit des AOP (Adverse outcome pathways) et sur la base de l'analyse de cancers modèles (foie, colon,...) et de leurs mécanismes connus.

En 2020, le groupe d'experts de l'OCDE a publié un article consensuel décrivant les grandes lignes du IATA avec les événements initiateurs moléculaires (MIE) du métabolisme cellulaire et les interactions avec les récepteurs, suivis par les premiers événements clés (KE) de l'inflammation, du dysfonctionnement immunitaire, de la signalisation mitotique ou des lésions cellulaires, pouvant conduire à la prolifération cellulaire (anormalement) prolongée, puis à la transformation morphologique précédant la formation de tumeurs (Jacobs *et al.*, 2020).

La construction du IATA a été affinée par une organisation modulaire traitant successivement de l'information existante, des MIE, des essais mécanistiques (KE), jusqu'aux effets adverses non adaptatifs et irréversibles, et concluant par une analyse du poids de l'évidence.

Lors de sa réunion de septembre 2024, le groupe d'expert a accepté de manière consensuelle la structure modulaire du IATA (Louekari & Jacobs, 2024) et la proposition de lignes directrices relatives à l'inhibition de la communication inter-cellulaire et à l'essai de transformation cellulaire Bhas42 couplé aux études transcriptomiques. Il est bon de souligner que ces propositions sont en totale adéquation avec celles du projet PARC en cours (Audebert *et al.*, 2023).

Pour conclure, rappelons qu'actuellement, les essais requis par le règlement REACH n'incluent pas d'essais *in vitro* spécifiques des NGTxC et que les essais de screening des NGTxC ne sont obligatoires sous aucune législation. Une fois validés et acceptés à l'échelle internationale par l'OCDE, il deviendra possible de les intégrer aux différentes réglementations ; ce qui facilitera considérablement l'identification des cancérogènes non génotoxiques.

Audebert M, Assmann AS, Azqueta A *et al.* (2023) New approach methodologies to facilitate and improve the hazard assessment of non-genotoxic carcinogens-a PARC project. *Front Toxicol* 5:1220998.

Jacobs MN, Colacci A, Corvi R, Vaccari M, *et al.* (2020). Chemical carcinogen safety testing: OECD expert group international consensus on the development of an integrated approach for the testing and assessment of chemical non-genotoxic carcinogens. *Arch. Toxicol.* 2020;94:2899–2923.

Louekari K, Jacobs MN (2024) A modular strategy for the testing and assessment of non-genotoxic carcinogens. *Archives of Toxicology* (2024) 98:2463–2485; <https://doi.org/10.1007/s00204-024-03753-y>.

Paule Vasseur – Marc Audebert

→ Consultations publiques en cours

Les documents ci-dessous sont actuellement soumis à consultations publiques :

- Draft TG on IL-2 LTT assay for immunosuppression **jusqu'au 9 décembre 2024**,
- Draft updated TG 497 on Defined Approach for Skin Sensitisation et documents associés. **jusqu'au 12 décembre 2024**,
- Draft revised Guidance Document 122 on the Dung Beetle toxicity test, **jusqu'au 11 décembre 2024**.

→ Personnes-contacts

Vos interlocuteurs sont les suivants :

- Activités en lien avec l'évaluation des effets sur la santé (section 4) :
Enrico MOMBELLI (enrico.mombelli@ineris.fr, 03 44 61 81 44),
- Activités en lien avec les autres domaines (section 1 : propriétés physico-chimiques ; section 2 : Effets sur les systèmes biologiques ; section 3 : Dégradation et accumulation ; section 5 : Autres lignes directrices) :
Pascal PANDARD (pascal.pandard@ineris.fr, 03 44 55 67 19).